CHAPITRE 2.7.6.

BRONCHITE INFECTIEUSE AVIAIRE

RÉSUMÉ

La bronchite infectieuse aviaire (BI) est définie habituellement comme une maladie aiguë, contagieuse du poulet, caractérisée principalement par de symptômes respiratoires. Cependant les infections dues au virus de la BI peuvent aussi conduire à une néphrite (aiguë ou chronique) et à des troubles de la ponte chez la poule. La sévérité des infections respiratoires dues au virus de la bronchite infectieuse (VBI) peut être augmentée lors de la présence d'autres agents pathogènes dans le tractus respiratoire. Les symptômes observés ne permettent pas de diagnostiquer la BI et la confirmation d'une suspicion nécessite l'isolement du virus ou la détection de l'antigène viral, bien que les examens sérologiques puissent aussi être utiles dans certaines circonstances. L'utilisation généralisée de vaccins à virus vivants et inactivés peut compliquer à la fois l'isolement du virus et le diagnostic sérologique de la BI. L'apparition de souches antigéniques variantes sur le terrain peut expliquer l'inefficacité de l'immunité induite par les vaccins conventionnels. Récemment des coronavirus génétiquement similaires au VBI ont été isolés de dindons et de faisans.

Le diagnostic de laboratoire est effectué par l'isolement du virus sur embryons de poulet ou sur des cultures de trachée. Il peut être aussi associé à des techniques d'immunofluorescence, de microscopie électronique, d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), au test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) ou aux méthodes immuno-enzymatique (ELISA).

***Identification de l'agent pathogène :** le VBI peut être isolé de la muqueuse trachéale et du poumon pendant la phase aiguë de la forme respiratoire de la maladie. Sinon, les fèces, les reins et les amygdales caecales seront les meilleures sources de virus.*

Les embryons de poulets provenant d'élevages exempts d'agents pathogènes spécifiques ou des anneaux de trachée d'embryons âgés de 20 jours sont utilisés pour l'isolement viral. L'inoculation de la cavité allantoïdienne d'embryons âgés de 9 à 11 jours avec le VBI provoque la mort ou le retard de croissance de l'embryon, généralement après 3 passages en série. Les anneaux trachéaux présentent l'avantage de permettre l'observation d'une stase des cils trachéaux dès la première inoculation avec l'identification de l'action du VBI par un test de neutralisation utilisant des sérums spécifiques. L'antigène peut être visualisé dans les cellules allantoïdiennes infectées par immunofluorescence ou par microscopie électronique après concentration par ultracentrifugation.

Le typage du VBI est difficile et controversé. Dans le même laboratoire, une série limitée de souches peuvent être considérées comme antigéniquement apparentées ou différentes en utilisant des techniques sérologiques variées. L'emploi des anticorps monoclonaux peut s'avérer utile pour distinguer les souches vaccinales des souches du terrain et pour définir les sérotypes. Le génotypage des isolats de BI avec la technique de la PCR devient plus facilement disponible.

***Épreuves sérologiques :** la surveillance régulière des titres d'anticorps BI dans les sérums des élevages indique le niveau de la réponse vaccinale. Du fait que de nombreux sérums aviaires, en particulier chez les oiseaux âgés, peuvent contenir des anticorps présentant un risque important de réactions croisées avec des souches sans lien antigénique, le diagnostic sérologique ne peut être utilisé avec un degré élevé de confiance lors de suspicion d'un foyer de BI. Le test d'IHA est rapide, peu coûteux, pratique et permet parfois dans certains cas d'identifier l'infection par un virus antigéniquement variant. On peut trouver dans le commerce des trousses de diagnostic ELISA très sensibles permettant de suivre la réponse immunitaire lors de vaccination mais ils manquent de spécificité.*

Un diagnostic positif de BI est réalisé par l'isolement du virus associé à des tests démontrant une élévation significative des anticorps spécifiques. Après la préparation d'un antisérum monospécifique pour un isolat viral, une comparaison sérologique peut être réalisée avec les souches connues pour permettre l'identification d'un sérotype.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *on peut utiliser des vaccins à virus vivants atténués et des vaccins à virus inactivés adjuvés huileux. Les vaccins à virus vivants, atténués par passage en série sur œufs embryonnés, confèrent une meilleure immunité locale au niveau du tractus respiratoire. Certains vaccins à virus vivants présentent le risque d'un pouvoir pathogène résiduel associé à une réversibilité de l'atténuation vaccinale dans les élevages. Cependant, la vaccination de masse avec des vaccins à virus vivants ne présente généralement pas de danger. Les inconvénients liés aux vaccins à virus vivants peuvent être palliés par l'emploi des vaccins à virus inactivés.*

Les vaccins à virus inactivés doivent être administrés individuellement et une simple inoculation n'est pas protectrice si elle n'est pas précédée par l'administration d'un vaccin à virus vivant. Ces deux types de vaccins sont disponibles en association avec le vaccin contre la maladie de Newcastle. Dans certains pays, des vaccins multivalents à virus inactivés comprenant les valences maladie de Newcastle, maladie de Gumboro, réovirose et « syndrome chute de ponte 76 » sont disponibles.

A. INTRODUCTION

La bronchite infectieuse aviaire (BI) a été décrite pour la première fois aux États-Unis d'Amérique (USA) dans les années trente en tant que maladie respiratoire aiguë touchant surtout les jeunes poulets. Le virus découvert par la suite fut appelé virus de la bronchite infectieuse aviaire (VBI). Ce VBI est un membre du genre *Coronavirus*, famille des *Coronaviridae*, de l'ordre des Nidovirales. Le virus est non-segmenté, de sens positif, avec un génome comprenant un simple brin d'ARN.

Le VBI affecte les poulets de tous âges qui, à part les faisans et les pintades, sont les seules espèces connues affectées naturellement. La BI est rencontrée dans le monde entier sous différentes formes cliniques, la principale étant un syndrome respiratoire classique. L'infection de l'oviducte peut provoquer des lésions irréversibles chez les jeunes poulettes dépourvues d'anticorps vitellins. Chez les oiseaux plus âgés, on observe un arrêt de la ponte ou la production d'œufs à coquille mince ou déformée et décolorée. La BI peut provoquer des troubles rénaux avec une néphrite aiguë, une urolithiase, et une mortalité (10). Après une amélioration apparente, une néphrite chronique peut provoquer une mort subite un peu plus tard, en particulier chez les oiseaux de race brune. Le virus peut persister dans le tractus intestinal et être excrété dans les fientes pendant de longues périodes. Ceci s'observe aussi bien avec les souches vaccinales qu'avec les souches sauvages du terrain (2).

Il n'a jamais été observé une infection humaine avec le VBI.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

La confirmation du diagnostic est obtenue par la mise en évidence de l'antigène viral, parfois associé à l'examen sérologique. L'emploi généralisé de vaccins à virus vivants et atténués peut compliquer le diagnostic utilisant des méthodes sérologiques car les anticorps d'origines vaccinale et sauvage ne peuvent pas être toujours distingués. La persistance d'un vaccin à virus vivant peut aussi compliquer les essais d'isolement de l'agent causal.

1. Identification de l'agent pathogène

a) Prélèvements

Les prélèvements effectués sur les oiseaux doivent se rapporter à la maladie suspectée. Dans le cas d'une maladie respiratoire aiguë, des écouvillons du tractus respiratoire supérieur des oiseaux vivants ou des prélèvements de trachée et de poumons des oiseaux récemment euthanasiés doivent être conservés dans la glace dans un milieu de transport comportant de la pénicilline (10 000 unités internationales [UI]/ml) et de la streptomycine (10 mg/ml). Chez des oiseaux atteints de néphrite ou de troubles de la ponte, les prélèvements doivent concerner les reins ou l'oviducte, mais les prélèvements du gros intestin, en particulier les amygdales caecales ou les fientes, offrent les plus grandes chances d'isoler le virus (2). Cependant, les isolements provenant du tractus intestinal ne permettent pas de dater le moment de l'infection ou de la maladie clinique. C'est pourquoi il importe de toujours prévoir des prélèvements du tractus respiratoire.

Les prélèvements tissulaires provenant de la trachée, des reins, de l'oviducte ou des amygdales caecales dans un milieu de transport additionné d'antibiotiques et les écouvillons du tractus respiratoire ou du cloaque dans un tube sec peuvent aussi être envoyés à des laboratoires spécialisés utilisant la recherche du virus par la technique de la transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) (7). Pour les prélèvements devant être envoyés à un laboratoire de diagnostic, il est essentiel qu'ils soient réfrigérés ou congelés avant le transport avec maintien de la chaîne du froid. Les prélèvements pour l'examen histopathologique doivent être effectués sur des carcasses de poulets récemment euthanasiés. Les prélèvements sanguins des oiseaux atteints d'une forme aiguë doivent aussi faire l'objet d'un examen sérologique.

b) Culture

Des suspensions de prélèvements tissulaires diluées (10 à 20 g/100 ml soit 10 à 20 %) sont préparées avec une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) ou un milieu nutritif pour inoculation à l'œuf ou un milieu de culture utilisé pour les cultures d'anneaux trachéaux (CAT) (10, 16). Les suspensions sont clarifiées par centrifugation lente et filtration sur des filtres bactériens (0,2 µ) avant inoculation sur œuf ou sur CAT.

Les œufs embryonnés de poulet et les CAT sont largement utilisés pour titrer le virus ou pour effectuer les isolements primaires du virus. Les cultures cellulaires ne sont pas employées pour l'isolement primaire car il est souvent nécessaire d'adapter les isolats du VBI sur les œufs embryonnés avant d'observer un effet cytopathogène (ECP) de l'infection virale.

Les œufs utilisés pour les cultures du VBI doivent provenir d'oiseaux n'ayant jamais été infectés ou vaccinés. De tels œufs doivent provenir de préférence de poules exemptes d'agents pathogènes spécifiques (EAPS). Le plus souvent, 0,1 à 0,2 ml du surnageant de l'échantillon est inoculé dans la cavité allantoïdienne d'embryons âgés de 9 à 11 jours. Ensuite les embryons sont observés tous les jours. Toute mortalité survenant dans les 24 h doit être considérée comme non spécifique et les œufs sont éliminés. Habituellement, l'inoculum initial n'a pas d'effet sur l'embryon, sauf s'il s'agit d'une souche vaccinale déjà adaptée à l'œuf. Normalement, les liquides allantoïdiens de tous les œufs, récoltés 3 à 7 jours après l'inoculation, sont mélangés. Ce mélange est dilué au 1/5 ou au 1/10 dans un milieu additionné d'antibiotiques en vue d'un nouveau passage sur d'autres œufs. Ces passages en aveugle sont répétés jusqu'à l'obtention d'un effet du virus. En règle générale, une souche sauvage induit des troubles tératogènes sur l'embryon (embryons chétifs, rabougris avec un mauvais emplumement et des dépôts d'urate dans le mésonéphros) au second ou au troisième passage. Aux passages suivants, on peut observer une mortalité. D'autres virus, le plus souvent des adénovirus, peuvent aussi provoquer des lésions similaires au VBI. Le liquide allantoïdien ne doit pas agglutiner les hématies et l'isolement du VBI doit être confirmé par des tests immunologiques et génotypiques. Les liquide allantoïdiens infectieux doivent soit être conservés à –60°C ou moins pour une longue conservation, soit à 4°C après lyophilisation.

Les CAT préparés à partir d'embryons âgés de 20 jours peuvent être utilisés directement pour isoler le VBI à partir d'échantillons du terrain (16). Un système de coupe automatique est nécessaire pour obtenir des sections transversales adéquates pour cette technique (20). Les anneaux doivent avoir 0,5 à 1 mm d'épaisseur et doivent être maintenus dans un milieu d'Eagle's N-2-hydroxyethylpiperazine N'-2-ethanesulphonic acid (HEPES) sur tubes tournants (15 tours/mn) à 37°C. L'infection de ces cultures de trachées se traduit par une ciliostase en 24 à 48 h. La ciliostase peur être produite par d'autres virus et la suspicion d'un cas de BI doit être confirmée par des tests immunologiques et génotypiques.

c) Méthodes d'identification

Le test de séroneutralisation virale (SN) sur œufs embryonnés et la technique d'immunodiffusion sont utiles pour l'identification du virus (cf. plus bas). Les tests de fluorescence sur les cellules présentes dans les liquides allantoïdiens des œufs infectés permettent aussi de montrer la présence du VBI (11). L'examen direct en microscopie électronique en contraste négatif permet de révéler les particules virales avec l'aspect très typique des coronavirus dans les liquides allantoïdiens ou le milieu de culture des CAT après concentration. La présence spécifique du VBI dans le liquide allantoïdien peut être détectée par amplification avec la RT-PCR et l'emploi d'une sonde ADN dans un test dot-hybridation (27). Le marquage direct par immunofluorescence des CAT permet une détection rapide du VBI (3). L'immunohistochimie, avec l'emploi d'anticorps monoclonaux spécifiques de groupe peut aussi permettre d'identifier le VBI sur les membranes chorioallantoïdiennes infectées (35).

d) Identification des sérotypes

De nombreux rapports ont décrit la variation antigénique et biologique des souches du VBI (10, 15, 22, 23, 26), mais il n'existe pas actuellement de classification agréée définitive. Néanmoins les relations et les différences antigéniques entre les souches sont importantes car les vaccins basés sur un

sous-type particulier peuvent n'offrir qu'une faible protection, voire pas de protection du tout, vis-à-vis d'un groupe antigéniquement différent. Du fait de l'émergence régulière de variants antigéniques, les virus et, par conséquent les aspects de la maladie et les vaccins utilisés, peuvent être tout à fait différents selon la région géographique. Un contrôle permanent des virus sur le terrain est nécessaire pour la production de vaccins efficaces face à la survenue possible de variants antigéniques. Le sérotypage des isolats de VBI et des souches a été effectué avec le test de séroneutralisation sur œufs embryonnés (22), sur CAT (21) et sur cultures cellulaires (24). La neutralisation des foyers immunofluorescents a été aussi utilisée pour différentier les souches (18). Le test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) a été aussi employé pour sérotyper le VBI (1, 29) et l'efficacité de cette méthode est prouvée à la condition d'utiliser des sérums précoces.

Des anticorps monoclonaux (AcM), utilisés habituellement avec la méthode immuno-enzymatique (ELISA), sont utiles pour différencier les souches et les groupes du VBI (25, 31). Les limites dans leur utilisation pour définir le sérotype du VBI sont liées au manque d'AcMs ou d'hybridomes et à la nécessité de produire de nouveaux AcMs avec une bonne spécificité permettant de suivre le nombre toujours en augmentation des sérotypes variants émergents de la BI (28).

e) Identification du génotype

Les bases moléculaires de la variation antigénique ont été examinées, généralement par le séquençage du nucléotide du gène codant la protéine des spicules (S) ou, plus spécifiquement le gène codant la sous-unité S1 de la protéine S (5, 33) où le plus grand nombre d'épitopes identifiés par des anticorps neutralisants est observé (32). On n'observe pas une corrélation exacte avec les résultats de la SN dans la mesure où si d'un côté les différents génotypes présentent généralement de grandes différences (20 à 50 %) dans les séquences d'acides aminés de la sous-unité S1 (33), des virus autres qui sont clairement différenciables par séroneutralisation ne présentent seulement quant à eux que 2 à 3 % de différences dans les séquences d'acides aminés (5). Cependant, les résultats obtenus avec la séquence S1 en comparaison avec le sérotype identifié par séroneutralisation permettent de sélectionner les souches vaccinales sur la base des données fournies par le séquençage. Il a été suggéré que la nucléoprotéine pouvait jouer un rôle important dans l'induction de la protection contre les virus de la BI. Récemment, li a été montré que les coronavirus isolés de dindons et de faisans étaient génétiquement similaires au VBI, avec approximativement 90 % d'homologie pour le nucléotide situé dans la région II hautement conservé de la région 3' non traduites du génome du VBI (8, 9).

Le séquençage du nucléotide (en particulier de la partie S du gène) en utilisant des amorces appropriées représente la technique la plus utile pour différencier les souches du VBI. Elle a remplacé l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) et l'emploi des sondes ADN. Le séquençage du nucléotide a permis d'observer qu'il se produisait souvent une recombinaison entre les souches BI (6, 40). La technique de la RT-PCR est maintenant utilisée dans un grand nombre de laboratoires de diagnostic pour le séquençage et la caractérisation de nombreux sérotypes variants de BI isolés dans de nombreux pays (30).

2. Épreuves sérologiques

De nombreuses épreuves ont été décrites. Les épreuves considérées dans cette partie comprennent la séroneutralisation (SN) (22), l'immunodiffusion en gélose (IDG) (39), l'inhibition de l'hémagglutination (IHA) (1) et la technique ELISA (34). Chaque épreuve présente des avantages et des inconvénients dans les domaines de la pratique, de la spécificité, de la sensibilité et du coût. En général, pour les épreuves sérologiques de routine, les tests de SN sont trop coûteux et peu pratiques et l'épreuve d'IDG manque de sensibilité. Les tests d'IHA et ELISA conviennent aux recherches sérologiques de routine bien qu'ils diffèrent en spécificité. Des trousses de diagnostic ELISA sont disponibles avec des instructions détaillées et le test d'IHA est décrit ci-dessous. Une surveillance sérologique régulière des élevages avec la recherche des anticorps BI représente une aide pour vérifier la réponse vaccinale. Du fait que de nombreux sérums de poulet, en particulier d'oiseaux plus âgés, contiennent des anticorps pouvant montrer une réaction croisée importante avec des souches différentes antigéniquement, on ne peut retenir comme certainement fiable le diagnostic sérologique d'une suspicion clinique de BI.

a) Test de séroneutralisation

Pour les tests de SN tous les sérums doivent être préalablement chauffés à la température de 56°C pendant 30 min. Le virus est mélangé avec du sérum et placé en incubation pendant 30 à 60 min à 37°C ou à la température du laboratoire. On utilise le plus souvent des œufs embryonnés de poule, mais on peut aussi employer des cultures d'anneaux de trachée ou des cultures cellulaires. Deux méthodes ont été utilisées pour estimer le taux d'anticorps neutralisants. L'une emploie une concentration sérique constante réagissant avec des dilutions croissantes de virus (méthode alpha) et l'autre emploie un titre constant de virus et des dilutions croissantes de sérum (méthode bêta).

Dans la méthode alpha, des dilutions croissantes au 1/10^{e} du virus adapté à l'œuf sont ajoutées à une dilution fixe d'antisérum (habituellement au1/5^{e}) et chaque mélange est inoculé à un groupe de 5 à 10 œufs embryonnés. Le virus est titré parallèlement. La dose létale est calculée selon la méthode de Kärber ou celle de Reed et Muench. Les résultats sont exprimés en index de neutralisation (IN) représentant la différence logarithmique (log_{10}) entre le titre du virus et celui des mélanges virus/antisérum. La valeur de l'IN peut atteindre 4,5 à 7,0 dans le cas d'un mélange homologue virus/antisérum ; une valeur inférieure à 1,5 n'est pas spécifique mais un index de 1,5 peut être rencontré avec un virus hétérologue.

La méthode bêta est la plus utilisée pour le test de séroneutralisation sur œufs embryonnés. Des dilutions croissantes d'antisérum (au 1/2 ou au 1/4) sont ajoutées à un même volume de virus à dilution constante, généralement titrant 100 ou 200 DIE_{50} (dose de virus infectant 50 % des embryons) par 0,05 ml et 0,1 ml de chaque mélange est inoculé dans la cavité allantoïque de chacun des 5 à 10 œufs embryonnés utilisés. Un contrôle du titre du virus est pratiqué simultanément pour vérifier que le titre de la dilution de la solution virale reste compris entre $10^{1,5}$ et $10^{2,5}$ DIE_{50}. La dose létale est calculée selon la méthode de Kärber ou celle de Reed et Muench comme précédemment, mais les dilutions sont exprimées en logarithme de base 2 (log_2). Cette méthode bêta (virus constant/sérum variable) est aussi employée dans les tests de neutralisation sur cultures de trachées avec l'emploi de 5 tubes par dilution de sérum selon les méthodes classiques de virologie (21). Les résultats sont calculés selon la méthode Reed et Muench, et le titre du virus est exprimé en doses ciliostatiques moyennes par unité de volume (log_{10} DC_{50}). Les titres sériques sont aussi exprimés réciproquement en logarithme de base 2 (log_2). Ce test est plus sensible que les autres, mais les difficultés techniques rencontrées pour sa mise en œuvre ne permettent pas son utilisation en pratique courante.

b) L'inhibition de l'hémagglutination

Un protocole standard pour le test d'IHA pour le VBI a été décrit (1) et la méthode décrite ci-dessous est basée sur ce test standard. Plusieurs souches ou isolats du VBI peuvent agglutiner les hématies de poulets (HP) après un traitement enzymatique. Le virus utilisé pour produire l'antigène peut varier selon le diagnostic souhaité

- **Préparation de l'antigène**

L'antigène VBI doit subir un traitement enzymatique pour acquérir une activité hémagglutinante (HA). Ceci a été obtenu en premier lieu avec une enzyme comme une phospholipase C de type 1 commerciale, en mélangeant une suspension virale avec un volume égal de cette enzyme pour obtenir une concentration finale de 1 unité/ml dans la même solution tampon. Cependant une amélioration a été obtenue avec l'emploi d'un filtrat grossier d'une culture de *Clostridium perfringens*, et il semble qu'une enzyme contaminante est responsable de l'activité plutôt que la phospholipase. Un travail ultérieur a permis de noter que cette enzyme est probablement une neuraminidase (36). Le liquide allantoïque infecté est centrifugé à 30 000 ***g*** pendant 3 h et le culot est remis en suspension à la concentration au 1/100^{e} du filtrat de *Clostridium perfringens* type A et mis en incubation à 37°C pendant 2 h.

Pour les tests HA et IHA, il est préférable d'appliquer les procédures à 4°C.

- **Test d'hémagglutination**

i) Distribuer 0,025 ml d'un tampon PBS isotonique, pH 7,0 à 7,4, dans chaque puits d'une microplaque pour titrage en matière plastique ;

ii) Placer 0,025 ml de l'antigène viral dans le premier puits. Pour une délimitation plus précise du contenu hémagglutinant, il faut faire des séries de dilutions initiales rapprochées comme au 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, etc. ;

iii) Préparer des dilutions de l'antigène viral de 2 en 2 d'un volume de 0,025 ml dans toute la plaque ;

iv) Distribuer de nouveau 0,025 ml du tampon PBS dans chaque puits ;

v) Distribuer 0,025 ml de la suspension, d'hématies de poulet à 1 % (v/v) dans chaque puits ;

vi) Mélanger en remuant doucement la microplaque et laisser les hématies se déposer pendant 40 min à 4°C, lorsque le témoin « hématies de poulet » est stabilisé en présentant une pastille distincte ronde ;

vii) L'HA est déterminée en inclinant la plaque et en observant la présence ou l'absence de l'hémagglutination (aspect en « larme » des hématies qui coulent). Le titrage doit être lu à la plus haute dilution pour laquelle se produit une hémagglutination complète soit une HA à 100 % représentant l'unité hémagglutinante (UHA). Cela peut être calculé avec précision à partir des séries initiales de dilution.

- **Test d'inhibition de l'hémagglutination**

Le test d'IHA est utilisé pour le diagnostic et pour les programmes de surveillance de la réponse vaccinale des élevages.

i) Distribuer 0,025 ml de PBS dans chaque cupule de la plaque de microtitrage ;

ii) Placer 0,025 ml de sérum dans la première cupule de la plaque ;

iii) Effectuer des dilutions de 2 en 2 de 0,025 ml de volume de sérum dans la microplaque ;

iv) Ajouter 0,025 ml contenant 4 unités hémagglutinantes d'antigène viral dans chaque cupule et attendre 30 min ;

v) Ajouter 0,025 ml d'une suspension d'hématies de poulet à 1 % (v/v) dans chaque cupule et, après avoir mélanger doucement, laisser les hématies se déposer pendant environ 40 min alors que les hématies témoins se déposent en présentant un bouton rond très net ;

vi) Le titre du test d'IHA correspond à la plus haute dilution de sérum provoquant une complète inhibition de 4 unités hémagglutinantes de l'antigène viral. L'agglutination est appréciée plus exactement en inclinant les plaques. Seules les cupules où les hématies se déposent de façon identique que dans les cupules témoins (contenant seulement 0,025 ml de la suspension d'hématies et 0,05 ml de PBS) doivent être considérées comme ayant montré une inhibition ;

vii) La validité des résultats doit être appréciée à l'aide d'un sérum témoin négatif qui ne devra pas présenter un titre $>2^2$, et un sérum témoin positif dont le titre devra être égal au titre connu à plus ou moins une dilution près ;

viii) Les sérums sont habituellement considérés comme positifs s'ils présentent un titre égal ou supérieur à 2^4. Cependant, il faut noter que parfois dans les élevages EAPS, une très faible proportion d'oiseaux peut présenter un titre non spécifique de 2^4, mais habituellement ces oiseaux sont âgés de plus de 1 an.

c) Méthode immuno-enzymatique

La technique ELISA est la méthode sérologique la plus sensible, la plus précoce et donnant les taux d'anticorps les plus élevés par comparaison avec les autres épreuves (34). Elle n'est pas spécifique d'une souche ou d'un type, mais elle est appropriée pour le contrôle de la réponse vaccinale sur le terrain. Des trousses de diagnostic commerciales ELISA existent – elles sont basées sur différentes stratégies de détection des anticorps dirigés contre le VBI. Habituellement de telles épreuves ont été évaluées et validées par le fabricant et il importe de suivre scrupuleusement les instructions du mode d'emploi. Le test ELISA est largement utilisé pour identifier les élevages de poulets infectés par le virus BI et présentant un titre important. Si la BI réapparaît dans un autre élevage de cette ferme, il faut tenter d'isoler le virus pour ensuite le génotyper par RFLP ou par séquençage S1.

d) Immunodiffusion en gélose (IDG)

L'IDG peut être utilisée pour le diagnostic de la BI (39). L'antigène est préparé à partir d'un homogénat de membranes chorioallantoïques d'embryons de poulets infectés. La souche Beaudette létale pour l'embryon est souvent utilisée pour produire l'antigène. Le test manque de sensibilité et risque de donner des résultats inégaux car la présence et la persistance des anticorps précipitants chez les oiseaux varient selon les individus.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Tous les virus des vaccins à virus vivants doivent être atténués ou naturellement apathogènes. Actuellement de nombreux pays n'autorisent que des vaccins à virus vivants préparés à partir du type Massachusetts. Une seule inoculation de vaccin à VBI inactivé a peu de chance de conférer une protection complète jusqu'à la fin de période de ponte si elle n'est pas précédée par une primovaccination, le plus souvent avec un vaccin à virus vivant. Les vaccins à virus inactivés sont administrés individuellement aux oiseaux par une injection intramusculaire ou sous-cutanée alors que les vaccins à virus vivants peuvent être utilisés en aérosols, dans l'eau de boisson ou par administration oculaire. Les vaccins à virus vivants confèrent une meilleure immunité locale au niveau du tractus respiratoire et permettent une protection contre un large spectre de souches du terrain (16, 17). Les vaccins à virus vivants ne peuvent protéger les élevages de pondeuses pendant toute leur vie économique en raison de risque important de survenue de sérotypes variants dans des élevages d'âges variables et les baisses du taux de ponte dès l'âge de 40 semaines n'est pas rare. Certains vaccins à virus vivants peuvent présenter un effet pathogène résiduel provoquant une réaction vaccinale dans l'élevage. Cependant les recommandations

concernant le mode d'administration de masse du vaccin (par aérosol ou eau de boisson) à l'élevage, en évitant l'emploi de doses vaccinales insuffisantes, doivent être suivies scrupuleusement si l'on veut protéger de façon satisfaisante tout l'élevage avec les vaccins à virus vivants. Les inconvénients concernant les vaccins à virus vivants peuvent être évités avec l'emploi des vaccins à virus inactivés.

Les vaccins les plus récents à virus inactivés avec un adjuvant huileux sont maintenant plus efficaces, en particulier lorsqu'ils sont précédés par l'emploi d'un vaccin à virus vivant. L'immunité humorale obtenue est plus durable. Des vaccins génétiquement modifiés (4) et une administration vaccinale *in ovo* sont en cours d'étude (38).

Les lignes directrices pour la fabrication de vaccins vétérinaires sont fournies dans le Chapitre I.1.7., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices exposées ici et dans le Chapitre 1.1.7. sont de nature générale. Dans chaque pays où ces vaccins BI sont fabriqués, les standards nationaux et internationaux doivent être respectés. L'autorité qui délivre les autorisations doit apporter des informations et un avis sur les critères requis. De nos jours, ceux-ci sont souvent présentés en termes généraux pour toute demande que ce soit pour des vaccins – aviaires et mammaliens – à virus vivants ou à virus inactivés, et pour des antiviraux ou antibactériens. Ils doivent aussi satisfaire à tous les critères applicables aux vaccins BI. Pour exemple, se reporter aux réglementations européenne et américaine (12-14, 37).

Les listes des agents étrangers qui doivent être absents continuent à s'allonger. Les producteurs doivent être familiers avec celles qui sont appliquées dans leur pays. Récemment, le virus de la néphrite aviaire et le pneumovirus aviaire ont été ajoutés.

Pour les vaccins BI, on peut rencontrer des différences importantes concernant les épreuves infectieuses pour les tests d'activité et leur validation. Traditionnellement on utilise la souche de type Massachusetts M-41 pour ces épreuves infectieuses à la fois pour les vaccins à virus vivants et à virus inactivés. Bien que ce type soit encore commun, il n'est plus le seul utilisé ni le principal dans plusieurs pays et il peut être recommandé de préparer des vaccins avec les autres types. Il est logique de réaliser les épreuves infectieuses avec le type de virus présent dans le vaccin. Il est plus difficile d'établir des critères pour la validation d'épreuves infectieuses avec les types non-Massachusetts en raison de leur plus faible virulence en général. Les vaccins à virus inactivés sont destinés à protéger contre les chutes du taux de ponte. L'épreuve classique avec la souche M-41, décrite dans ce chapitre, doit provoquer une chute d'au moins 67 % chez les témoins non vaccinés, mais des taux de chute beaucoup plus bas observés avec d'autres types doivent être considérés comme satisfaisants, en fonction des effets connus et publiés de ces souches sur le terrain. On observe une tendance à assouplir les critères des épreuves infectieuses avec le type Massachusetts et la Pharmacopée européenne définit maintenant une chute de ponte d'au moins 35 % pour les types Massachusetts et d'au moins 15 % pour les types non-Massachusetts lorsque la chute correspond à des données reposant sur des preuves documentées (14).

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Le lot de semence doit être utilisé pour tous les types de vaccins produits et pour les souches d'épreuve. Chaque virus est dénommé selon la souche, son origine et doit être exempt de toute contamination par d'autres souches de virus BI. Les souches de virus destinées aux vaccins ou aux épreuves infectieuses doivent être entreposées séparément.

Pour les vaccins à virus vivants, plusieurs pays n'acceptent que les souches de type Massachusetts. Quelques pays autorisent d'autres souches, généralement celles déjà présentes dans les élevages du pays. L'incorporation d'un type antigénique dans les vaccins à virus à la fois vivants et inactivés doit être justifiée si l'on doute de son existence dans le pays.

b) Méthodes de culture

Toutes les souches virales de semence sont cultivées dans le sac allantoïdien d'embryons de poulets ou sur cultures cellulaires appropriées. Les œufs doivent provenir d'un élevage EAPS.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

- **Pureté**

Chaque lot de semence doit être exempt de toute contamination bactérienne, fongique, mycoplasmique ou virale.

Pour la détection des virus étrangers, la souche de semence est d'abord traitée avec un antisérum monospécifique de titre élevé contre la souche en cause ou contre un type connu. Le mélange est mis en culture de plusieurs manières pour confirmer l'absence de tout virus connu comme contaminant potentiel.

L'antisérum ne doit pas comprendre d'anticorps dirigés contre les adénovirus, le virus de l'encéphalomyélite aviaire, le rotavirus aviaire, le virus de l'anémie infectieuse du poulet, le virus de la variole aviaire, le virus de la laryngotrachéite infectieuse aviaire, le virus influenza A, le virus de la maladie de Newcastle, le virus de la bursite infectieuse, les virus des leucoses aviaires, le réovirus, le virus de la maladie de Marek, l'herpesvirus du dindon, les virus associés aux adénovirus, le virus du syndrome chute de ponte 76 (EDS76), le virus de la néphrite aviaire, le pneumovirus aviaire ou le virus de la réticulo-endothéliose. L'inoculum ajouté dans chaque système de culture utilisé doit contenir une quantité de virus BI neutralisé dont l'infectiosité initiale doit être équivalente à au moins 10 fois la dose minimale du terrain. Ces systèmes sont :

1. des embryons de poulet EAPS âgés de 9 à 11 jours, inoculés à la fois dans le sac allantoïdien et sur la membrane chorioallantoïdienne (deux passages) ;

2. des cultures de fibroblastes d'embryon de poulet, pour les virus leucosiques des sous-groupes A et B. Le test de fixation du complément pour la leucose aviaire (test COFAL) ou le test ELISA en double sandwich pour les antigènes leucosiques spécifiques de groupe est réalisé sur des extraits cellulaires récoltés à 14 jours. Un test d'immunofluorescence pour le virus de la réticuloendothéliose est réalisé sur un tapis cellulaire, sur lamelles couvre-objet, après 2 passages ;

3. des cultures de cellules rénales de poulets EAPS sont utilisées pour la recherche d'un effet cytopathogène, d'inclusions cellulaires ou d'agents hémadsorbants après des passages correspondant à un temps d'incubation total jamais inférieur à 5 jours et jusqu'à 20 jours ;

4. des poussins EAPS dont l'âge correspond à l'âge minimal recommandé pour la vaccination sont inoculés par la voie intramusculaire avec 100 doses vaccinales et par la voie conjonctivale avec 10 doses vaccinales. Ce test est répété 3 semaines plus tard : les poulets sont inoculés dans la voûte plantaire et par la voie intranasale avec 10 doses vaccinales. Ces poussins sont observés pendant au moins 6 semaines et leur sérum est testé pour la recherche de l'encéphalomyélite aviaire, de la bursite infectieuse, de la maladie de Marek, de la maladie de Newcastle et d'une infection par *Salmonella pullorum*.

- **Activité**

Les vaccins indiqués pour une protection contre les chutes du taux de ponte doivent être testés pour la durée de la réponse humorale. Les titres IHA doivent être en moyenne > 6 $\log_2$ jusqu'à l'âge de 60 semaines. Les épreuves sérologiques doivent être réalisées à des intervalles suffisamment fréquents pour démontrer qu'il n'y a pas eu un effet de rappel provoqué par un VBI extérieur.

Les vaccins indiqués pour la protection des poulets de chair et des poulets d'élevage contre la forme respiratoire de la maladie doivent être testés de la même manière pour la durée de la réponse immunitaire. Cette réponse est testée jusqu'à l'âge de l'abattage pour les poulets de chair et jusqu'à l'âge du rappel vaccinal (le plus souvent à l'âge de 16 à 18 semaines) dans le cas des poulets d'élevage.

- **Innocuité**

Les tests pratiqués sur la souche virale de semence doivent inclure un test sur le risque de retour vers la virulence. La souche de semence des vaccins à virus vivants et inactivés doit être testée pour son innocuité selon les recommandations de la Section C.4.b.

- **Efficacité**

Pour démontrer l'efficacité, un essai doit être réalisé avec des vaccins obtenus à partir du lot de semence primaire et du lot de travail après 5 passages à partir du lot de semence primaire. Ils sont soumis à des tests démontrant leurs effets protecteurs.

Pour les vaccins à virus vivants, au moins 10 poussins EAPS âgés de 3 à 4 semaines sont vaccinés par voie intranasale ou oculaire avec la dose recommandée. Dix poussins témoins non vaccinés du même âge sont gardés séparément. Tous les oiseaux des deux groupes sont éprouvés 3 à 4 semaines plus tard par les voies intranasale ou oculaire, chacun recevant $10^{3,0}$–$10^{3,5}$ DIE_{50} de la souche virulente Massachusetts M-41. Un prélèvement par écouvillonnage de la trachée est pratiqué sur chaque oiseau 4 à 5 jours après l'épreuve et placé dans 3 ml d'un milieu de culture liquide avec antibiotiques. Chaque milieu est testé pour la recherche du VBI par inoculation (0,2 ml) de 5 œufs embryonnés âgés de 9 à 11 jours. Un autre test alternatif à ces écouvillonnages consiste à tuer les oiseaux 4 à 6 jours après l'épreuve et à examiner au microscope l'activité ciliaire des anneaux de trachée (19). Les oiseaux n'ayant pas résisté à l'épreuve présentent une perte importante de la motilité ciliaire. Les vaccins à virus vivants sont satisfaisants si au moins 90 % des poussins vaccinés et éprouvés ne montrent pas la présence du VBI dans leur trachée alors que 80 % ou plus des poussins témoins montrent la présence du virus.

Pour évaluer un vaccin à virus inactivé destiné à protéger des poules pondeuses, au moins 30 poussins EAPS sont vaccinés à la dose préconisée à l'âge le plus jeune recommandé pour cette vaccination. Si une primovaccination avec un vaccin à virus vivant est d'abord effectuée, un groupe supplémentaire d'oiseaux reçoit seulement le vaccin à virus vivant. Dans les deux cas, ces primovaccinations ne doivent pas être faites au delà de l'âge de 3 semaines. Le vaccin à virus inactivé est administré 4 à 6 semaines après la primovaccination avec le vaccin à virus vivant. Un autre groupe de 30 oiseaux témoins non-vaccinés est prévu parallèlement. Tous les groupes sont hébergés séparément jusqu'à 4 semaines avant le pic de la production des œufs puis ils sont réunis dans le même bâtiment. La production individuelle en œufs est surveillée et lorsqu'elle devient régulière tous les oiseaux sont éprouvés, la surveillance de la production d'œufs étant prévue encore pendant 4 semaines. L'épreuve doit être suffisante pour assurer une baisse du taux de ponte pendant les 3 semaines suivant l'intervention. La baisse du taux de ponte du groupe témoin doit être au moins de 67 %. Le groupe recevant le vaccin à virus vivant en primovaccination suivi d'un rappel avec le vaccin à virus inactivé doit rester au taux précédent et le groupe ne recevant que la primovaccination doit montrer un taux intermédiaire de baisse de la production. Les sérums collectés chez tous les oiseaux au moment de la vaccination, 4 semaines plus tard et au moment de l'épreuve doivent être négatifs chez les oiseaux témoins.

Pour évaluer un vaccin à virus inactivé destiné à protéger des oiseaux contre la maladie respiratoire, 20 poulets EAPS âgés de 4 semaines sont vaccinés selon les recommandations du fabricant. Un autre groupe de 20 oiseaux du même âge et de même origine est hébergé avec ce premier groupe. La réponse humorale est déterminée 4 semaines plus tard ; il ne doit pas y avoir de réponse immunitaire chez les oiseaux témoins. Tous les oiseaux sont éprouvés avec 10^3 DIP_{50} (Dose de virus infectant 50 % des poussins) de virus virulent, tués 4 à 7 jours plus tard et les sections de trachée sont examinées pour leur motilité ciliaire. Au moins 80 % des témoins non-vaccinés doivent présenter une ciliostase complète alors qu'un même pourcentage d'oiseaux vaccinés doit montrer qu'il n'a pas été affecté.

Des vaccins, à virus vivant comme à virus inactivé, contenant les valences maladie de Newcastle, bursite infectieuse, réovirose et syndrome chute de ponte 76 (RDS76) sont disponibles dans certains pays. L'efficacité de ces différentes valences vaccinales doit être établie indépendamment puis sur l'association au cas où il existerait une éventuelle interférence entre ces différents antigènes.

2. Méthodes de fabrication

Toutes les souches virales destinées aux vaccins à virus vivants sont cultivées dans le sac allantoïdien d'œufs embryonnés de poulets EAPS ou sur cultures cellulaires appropriées. Pour les vaccins à virus inactivés, les œufs de poules issues d'élevages non EAPS peuvent être utilisés. Le mélange récolté est clarifié puis titré pour son infectiosité. Pour les vaccins à virus vivants, ce liquide est lyophilisé dans des ampoules alors que pour les vaccins à virus inactivés il est mélangé à une huile minérale de haute qualité pour former une émulsion à laquelle un conservateur est ajouté.

3. Contrôle en cours de fabrication

Le contrôle du titre en antigène requis est basé sur les tests initiaux pratiqués sur les lots de vaccins prouvant leur efficacité dans des essais au laboratoire et sur le terrain. Les titres infectieux sont évalués sur des embryons de poulet.

Les vaccins à virus vivants ne doivent pas contenir moins de $10^{3,5}$ DIE_{50} par dose pour un oiseau jusqu'à la date d'expiration indiquée, et pas moins de $10^{2,5}$ DIE_{50} par dose pour un oiseau après une incubation à 37°C pendant 7 jours à la fin de l'observation. Pour les vaccins à virus inactivés, le fabricant doit démontrer l'efficacité de l'inactivation de l'agent et du procédé d'inactivation à la fois pour le virus BI et les contaminants potentiels. Avec l'utilisation de la bêta-propiolactone ou du formol, tous les virus leucosiques vivants et toutes les espèces de *Salmonella* doivent être éliminés ; et, avec les autres agents utilisés pour l'inactivation, tous les contaminants potentiels doivent être inactivés. Avant les procédés d'inactivation, il est important de vérifier l'homogénéité des suspensions et le test d'inactivation doit être réalisé sur chaque lot récolté en vrac après inactivation et sur le produit fini.

Les tests d'inactivation doivent être appropriés au vaccin concerné et consistent à effectuer deux passages sur cultures cellulaires, sur œufs embryonnés ou sur poussins, en inoculant 0,2 ml et en renouvelant 10 fois par passage.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Chaque lot de vaccin à virus vivant doit être contrôlé pour l'absence de contamination comme pour le virus de semence (voir le Chapitre I.1.5., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques »).

b) Innocuité

- **Pour les vaccins à virus vivants**

Utiliser au moins 10 poulets EAPS ayant l'âge minimal requis pour la vaccination comme indiqué sur la notice du vaccin. Administrer par instillation oculaire à chaque poulet 10 doses de vaccin reconstitué de manière à obtenir une concentration adaptée à ce test. Observer les poulets pendant 21 jours. Pour les vaccins indiqués pour les poulets âgés de 2 semaines ou plus, utiliser les poulets inoculés dans « le test pour les agents étrangers utilisant les poulets » (voir Section C.1.c.4.). Si, pendant la période d'observation, plus de 2 poulets meurent d'une cause non attribuable au vaccin, répéter le test. Le vaccin est satisfaisant pour ce test si les poulets ne présentent pas de signes cliniques graves, en particulier des signes respiratoires et qu'aucun poulet ne meure d'une cause attribuable au vaccin.

- **Pour les vaccins à virus inactivés**

Injecter une double dose de vaccin par la voie recommandée par le fabricant à chacun des 10 poulets EAPS âgés de 14 à 28 jours. Observer les poulets pendant 21 jours. Il faut vérifier qu'il n'y a aucune réaction anormale locale ou systémique.

c) Activité

Le test d'activité est établi à partir des résultats des tests d'efficacité réalisés sur le lot de semence primaire. Les tests d'activité des vaccins à virus vivants sont réalisés par le titrage de l'infectiosité et pour les vaccins à virus inactivés, ces tests consistent à mesurer la production d'anticorps. Le test d'activité du lot de vaccin à virus inactivé consiste à vacciner 20 poulets EAPS âgés de 4 semaines et à montrer que leur titre moyen par le test d'IHA n'est pas inférieur à 6 $\log_2$, 4 semaines plus tard.

d) Durée de l'immunité

Le vaccin doit montrer qu'il présente l'activité requise pour atteindre la durée d'immunité revendiquée à la fin de la durée de conservation.

e) Stabilité

Au moins 3 lots doivent être testés pour leur stabilité et doivent donner des résultats satisfaisants 3 mois au delà de la durée de conservation mentionnée.

La stabilité du vaccin à virus vivant doit être mesurée par le maintien d'un titre infectieux satisfaisant.

La stabilité du vaccin à virus inactivé est mesurée à des intervalles réguliers lors des tests d'efficacité des lots. La concentration du conservateur et la persistance de la durée de conservation doivent être vérifiées.Il ne doit pas exister de modifications physiques du vaccin et l'émulsion initiale doit être retrouvée après une rapide secousse.

f) Agents de conservation

Il y a un taux maximal dans les conditions d'emploi des antibiotiques, des agents de conservation ou des agents résiduels utilisés pour l'inactivation.

g) Précautions et mise en garde

Le virus BI n'est pas connu pour présenter un danger quelconque pour le personnel préparant les vaccins ou les testant. Cependant certains agents étrangers peuvent être nocifs et les premières étapes dans l'emploi du lot de semence doivent être réalisées dans un local sécurisé. Il s'agit de prendre la plus grande précaution dans toutes les productions de vaccins pour diminuer le risque d'exposition du personnel à des aérosols de protéines étrangères. Les personnes allergiques aux œufs ne doivent pas être employées pour ce travail.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Un test d'innocuité doit être réalisé sur chaque lot du produit fini, comme indiqué dans la Section C.4.b.

b) Activité

Un test d'activité doit être réalisé sur chaque lot du produit fini, comme indiqué dans la Section C.4.c., chez le fabricant et à la fin de la période de conservation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALEXANDER D.J., ALLAN W.H., BIGGS P.M., BRACEWELL C.D., DARBYSHIRE J.H., DAWSON P.S., HARRIS A.H., JORDAN F.T., MACPHERSON I., MCFERRAN J.B., RANDALL C.J., STUART J.C., SWARBRICK O. & WILDING G.P. (1983). A standard technique for haemagglutination inhibition tests for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Vet. Rec.,* **113**, 64.

2. ALEXANDER D.J., GOUGH R.E. & PATTISON M. (1978). A long-term study of the pathogenesis of infection of fowls with three strains of avian infectious bronchitis virus. *Res. Vet. Sci.,* **24**, 228–233.

3. BHATTACHARJEE P.S., NAYLOR C.J. & JONES R.C. (1994). A simple method for immunofluorescence staining of tracheal organ cultures for the rapid identification of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.,* **23**, 471–480.

4. BINNS M.M., BOURSNELL M.E.G., TOMLEY F.M., MOCKETT A.P.A., CAVANAGH D. & BROWN T.D.K. (1986). Prospects for a genetically engineered vaccine against infectious bronchitis. *Israel J. Vet. Med.,* **42**, 124–127.

5. CAVANAGH D. (1991). Sequencing approach to IBV antigenicity and epizootiology. *In:* Proceedings of the Second International Symposium on Infectious Bronchitis. Rauischholzhausen, Germany, June 1991, 147–160.

6. CAVANAGH D., DAVIS, P.J. & COOK J.K.A. (1992). Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. *Avian Pathol.,* **21**, 401–408.

7. CAVANAGH D., MAWDITT K., BRITTON P. & NAYLOR C.J. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.,* **28**, 593–605.

8. CAVANAGH. D., MAWDITT K., SHARMA. M., DRURY S.E., AINSWORTH H.L., BRITTON P. & GOUGH R.E. (2001). Detection of a coronavirus from turkey poults in Europe genetically related to infectious bronchitis virus of chickens. *Avian Pathol.,* **30**, 355-368.

9. CAVANAGH D., MAWDITT K., WELCHMAN D. DE B., BRITTON P. & GOUGH R.E. (2002) Coronaviruses from pheasants *(Phasianus colchicus)* are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. *Avian Pathol.,* **31**, 81–93.

10. CAVANAGH D. & NAQI S.A. (1997). Infectious Bronchitis. *In:* Diseases of Poultry, Tenth Edition, Calnek B. W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L.R. & Saif Y.M., eds. Iowa State Press, Iowa, USA, 511–526.

11. CLARKE J.K., MCFERRAN J.B. & GAY F.W. (1972). Use of allantoic cells for the detection of avian infectious bronchitis virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.,* **36**, 62–70.

12. COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (Interim Publication Nov. 1993). The Rules Governing Medicinal Products in the European Community. Volume VII: Guidelines for the Testing of Veterinary Medicinal Products.

13. COUNCIL OF EUROPE (1997). European Pharmacopoeia, Third Edition. Vaccinum bronchitidis infectivae aviariae vivum cryodesiccatum. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France, 1795–1796.

14. COUNCIL OF EUROPE (1997). European Pharmacopoeia, Third Edition. Vaccinum bronchitidis infectivae aviariae inactivatum. Council of Europe, Strasbourg, France, 1745–1746.

15. COOK J.K.A. (1984). The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. *Avian Pathol.,* **13**, 733–741.

16. COOK J.K.A., DARBYSHIRE J.H. & PETERS R.W. (1976). The use of chicken tracheal organ cultures for the isolation and assay of avian infectious bronchitis virus. *Arch. Virol.,* 50, 109–118.

17. COOK J.K.A., ORBELL S.J., WOODS M.A. & HUGGINS M.B. (1999). Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol.*, **28**, 477–485.

18. CSERMELYI M., THIJSSEN R., ORTHEL F., BURGER A.G., KOUWENHOVEN B. & LUTTICKEN D. (1988). Serological classification of recent infectious bronchitis virus isolates by the neutralisation of immunofluorescent foci. *Avian Pathol.*, **17**, 139–148.

19. DARBYSHIRE J.H. (1985). A clearance test to assess protection in chickens vaccinated against avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.,* **14**, 497–508.

20. DARBYSHIRE J.H., COOK J.K.A. & PETERS R.W. (1978). Growth comparisons of avian infectious bronchitis virus strains in organ cultures of chicken tissues. *Arch. Virol.,* **56**, 317–325.

21. DARBYSHIRE J.H., ROWELL R.G., COOK J.K.A. & PETERS R.W. (1979). Taxonomic studies on strains of avian infectious bronchitis virus using neutralisation tests in tracheal organ cultures. *Arch. Virol.,* **61**, 227–238.

22. DAWSON P.S. & GOUGH R.E. (1971). Antigenic variation in strains of avian infectious bronchitis virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.,* **34**, 32–39.

23. HOFSTAD M.S. (1958). Antigenic differences among isolates of avian infectious bronchitis virus. *Am. J. Vet. Res.,* **19**, 740–743.

24. HOPKINS S.R. (1974). Serological comparisons of strains of infectious bronchitis virus using plaque purified isolates. *Avian Dis.*, **18**, 231–239.

25. IGNJATOVIC J., MCWATERS P. & GALLI L. (1991). Antigenic relationship of Australian infectious bronchitis viruses: analysis using polyclonal and monoclonal antibodies. *In:* Proceedings of the Second International Symposium on Infectious Bronchitis. Rauischholzhausen, Germany, June 1991, 161–167.

26. IGNJATOVIC J. & SAPATS S. (2000). Avian infectious bronchitis virus. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.,* **19** (2), 493–508.

27. JACKWOOD M.W., KWON H.M. & HILT D.A. (1992). Infectious bronchitis virus detection in allantoic fluid using the polymerase chain reaction and a DNA probe. *Avian Dis.,* **36**, 403–409.

28. KARACA K., NAQI S.A. & GELB J. JR (1992). Production and characterisation of monoclonal antibodies to three infectious bronchitis virus serotypes. *Avian Dis*., **36**, 903–915.

29. KING D.J. & HOPKINS S.R. (1984). Rapid serotyping of infectious bronchitis virus isolates with the haemagglutination inhibition test. *Avian Dis.,* **28**, 727–733.

30. KINGHAM B.F., KEELER C.L. JR, NIX W.A., LADMAN B.S. & GELB J. JR (2000). Identification of avian infectious bronchitis virus by direct automated cycle sequencing of the S-1 gene. *Avian Dis.,* **44**, 325–335.

31. KOCH G., HARTOG L., KANT A., VAN ROOZELAAR D. & DE BOER G.F. (1986). Antigenic differentiation of avian bronchitis virus variant strains employing monoclonal antibodies. *Israel J. Vet. Med.,* **42**, 80–97.

32. KOCH G., KANT A., COOK J.K.A. & CAVANAGH D. (1992). Location of antigenic sites defined by neutralising monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolypeptide. *J. Gen. Virol*., **73**, 591–596.

33. KUSTERS J.G., NIESTERS H.G.M., LENSTRA J.A., HORZINEK M.C. & VAN DER ZEIJST B.A.M. (1989). Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. *Virology*, **169**, 217–221.

34. MOCKETT A.P.A. & DARBYSHIRE J.H. (1981). Comparative studies with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.,* **10**, 1–10.

35. NAQI S.A. (1990) A monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure for rapid detection of infectious bronchitis virus in infected tissues. *Avian Dis.,* **34**. 893–898.

36. SCHULTZE B., CAVANAGH D. & HERRLER G. (1992). Neuraminidase treatment of avian infectious bronchitis coronavirus reveals a haemagglutinating activity that is dependent on sialic acid-containg receptors on erythrocytes. *Virology*, **189**, 792–794.

37. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA), Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) (1 January, 1994). Code of Federal Regulations. § 113. 327 Bronchitis Vaccine. US Government Printing Office, Washington D.C., USA.

38. WAKENELL P. (1991). Vaccination of chicken embryos against infectious bronchitis virus. *In:* Proceedings of the Second International Symposium on Infectious Bronchitis. Rauischholzhausen, Germany, June 1991, 239–240.

39. WITTER R.L. (1962). The diagnosis of infectious bronchitis of chickens by the agar gel precipitin test. *Avian Dis.,* **6**, 478–492.

40. ZWAAGSTRA K.A., VAN DER ZEIJST B.A.M. & KUSTERS J.G. (1992). Rapid detection and identification of avian bronchitis virus. *J. Clin. Microbiol.,* **30**, 79–84.

*
* *